

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 00/06091

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12N9/10 C12N15/80 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RASMUSSEN JACK B ET AL: "The PYR1 gene of the plant pathogenic fungus Colletotrichum graminicola: Selection by intraspecific complementation and sequence analysis." MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 235, no. 1, 1992, pages 74-80, XP002151888 ISSN: 0026-8925 the whole document	1,2,4
A	EP 0 570 096 A (OJI PAPER CO) 18 November 1993 (1993-11-18) the whole document	
A	WO 98 55628 A (PFALLER RUPERT ; WICH GUENTER (DE); CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/EP 00/06091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0570096 A	18-11-1993	CA 2091236 A	10-09-1993
		JP 6054691 A	01-03-1994
		US 5362640 A	08-11-1994
WO 9855628 A	10-12-1998	DE 19724039 A	10-12-1998
		AU 8624698 A	21-12-1998
		CN 1259166 T	05-07-2000
		EP 0994950 A	26-04-2000
		NO 995948 A	07-02-2000
		PL 337465 A	14-08-2000



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 27 March 2001 (27.03.01)	
<b>International application No.</b> PCT/EP00/06091	<b>Applicant's or agent's file reference</b> CO 9904
<b>International filing date</b> (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)
<b>Applicant</b> PFALLER, Rupert	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 14 December 2000 (14.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Zakaria EL KHODARY Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01)	
<b>International application No.</b> PCT/EP00/06091	<b>Applicant's or agent's file reference</b> CO 9904
<b>International filing date</b> (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)
<b>Applicant</b> PFALLER, Rupert	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 14 December 2000 (14.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Zakaria EL KHODARY Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process. The second part of the paper presents the methodology used in the study, including the data collection methods and the analysis techniques. The third part of the paper discusses the results of the study and the conclusions drawn from the findings. The final part of the paper provides a summary of the key points and offers suggestions for further research.

The study was conducted in a systematic and rigorous manner, following the principles of scientific research. The data was collected from a large sample of participants, ensuring the representativeness of the findings. The analysis was performed using advanced statistical techniques, allowing for a detailed examination of the data. The results of the study are presented in a clear and concise manner, highlighting the key findings and their implications.

The findings of the study suggest that there is a significant relationship between the variables under investigation. This relationship is supported by the statistical analysis, which shows a strong correlation between the two variables. The results also indicate that the study has a high level of internal validity, suggesting that the findings are reliable and can be generalized to other contexts.

In conclusion, the study has provided valuable insights into the subject matter and has identified a significant relationship between the variables. The findings have important implications for the field and suggest that further research is needed to explore the underlying mechanisms and to test the generalizability of the results.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

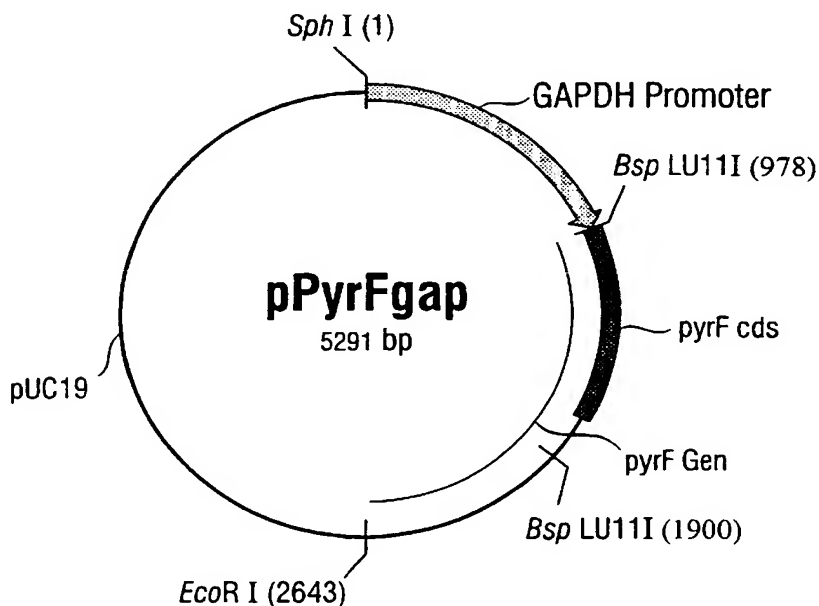
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/07620 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/31, 9/10, 15/80, 5/10 (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PFALLER, Rupert [DE/DE]; Nibelungenstrasse 6, D-80639 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06091 (74) Anwalt: POTTEN, Holger; Wacker-Chemie GmbH, Zentralbereich PML, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 2000 (29.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 34 408.6 22. Juli 1999 (22.07.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20, D-81379 München (DE).
- Veröffentlicht:  
— Mit internationalem Recherchenbericht.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PYRF GENE AND THE UTILIZATION THEREOF

(54) Bezeichnung: PYRF GEN UND SEINE VERWENDUNG



(57) Abstract: The invention relates to a pyrF gene and to the utilization thereof as selection marker gene for an expression system for the production of proteins in mushrooms of the genus Trametes, Coriolus or Polyporus. The pyrF gene is characterized in that it comprises DNS sequence SEQ ID NO:1 from position 1133 up to and including position 1877 or DNS sequence SEQ ID NO:2 from position 1 up to and including position 684 or a DNS sequence with a sequence homology greater than 60 % relative to the above-mentioned regions of sequence SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/07620 A1



*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein pyrF-Gen und seine Verwendung als Selektionsmarkergen für ein Expressionssystem zur Produktion von Proteinen in Pilzen der Gattungen *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus*. Das pyrF-Gen ist dadurch gekennzeichnet, daß es die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 1133 bis einschließlich Position 1877 umfaßt oder die DNS-Sequenz SEQ ID NO:2 ab Position 1 bis einschließlich Position 684 umfaßt oder eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 60 % zu den genannten Bereichen der DNS-Sequenz SEQ ID NO:1, oder SEQ ID NO:2 umfaßt.

### pyrF Gen und seine Verwendung

Die Erfindung betrifft ein pyrF-Gen und seine Verwendung als Selektionsmarkergen für ein Expressionssystem zur Produktion von Proteinen in Pilzen der Gattungen Trametes, Coriolus oder Polyporus.

Zur Proteinproduktion sind verschiedene prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt. Die Anmeldung DE-A-19814853 beschreibt ausführlich den diesbezüglichen Stand der Technik. DE-A-19814853 selbst offenbart ein Verfahren zur Transformation von filamentösen Pilzen aus den Gattungen Trametes und Polyporus, mit dem signifikant höhere Produktionsraten für ein jeweils exprimiertes Protein erzielt werden können. Die Anmeldung offenbart Expressionsvektoren, die genetische Regulationselemente für die Expression in filamentösen Pilzen der Klasse der Basidiomyceten enthalten. Sie erlauben bei Transformation filamentöser Pilze der Klasse der Basidiomyceten die Selektion positiver Transformanten aufgrund der Komplementation eines auxotrophen Gendefekts.

Der in DE-A-19814853 offenbarte Gendefekt betrifft das pyrG-Gen. Dieses Gen kodiert für die Orotidin-5'-Phosphat Decarboxylase. DE-A-19814853 offenbarte ferner Stämme mit einem Defekt im pyrG-Gen, die auf Minimalmedium nur in Gegenwart von Uridin wachsen können (Uridin Auxotrophie). Nach Transformation dieser Stämme mit DNS-Vektoren, die ein intaktes pyrG-Gen enthalten, wachsen die Uridin-auxotrophen Stämme wieder auf Minimalmedium ohne Uridin (Uridin Prototrophie).

Uridin-auxotrophe Stämme werden nach dem Stand der Technik (Boeke et al., Methods Enzymol. (1987) 154, 164 - 175) durch Behandlung mit der genotoxischen Substanz 5-Fluor-Orotsäure (FOA) isoliert. Bei der Behandlung mit FOA erzeugte Uridin-auxotrophe Stämme besitzen einen genetischen Defekt entweder im

pyrG-Gen oder im pyrF-Gen. Das pyrF-Gen wird auch *ura5*-Gen genannt. Es kodiert für das Enzym Orotsäure-Phosphoribosyltransferase.

- 5 Auch Uridin-auxotrophe Basidiomycetenstämme mit einem Defekt im pyrF-Gen wären wertvolle Stämme für die Transformation zum Zweck der Proteinproduktion, wenn das intakte pyrF-Gen aus Basidiomyceten als Selektionsmarkergen für die effiziente Transformation zur Verfügung stünde. PyrF-Gene sind aber bisher nur  
10 für Pilze aus der Klasse der Ascomyceten wie z. B. *Podospora anserina* (Gene 53 (1987), 201 - 209), *Kluyveromyces lactis* (unveröffentlicht, die DNS-Sequenz ist in der „Genbank“ Datenbank unter der Zugangsnummer klj001353.gb\_plargelegt) oder *Yarrowia lipolytica* (M. Sanchez et al., Yeast 11 (1995), 425 - 433) be-  
15 schrieben worden. Dagegen sind keine pyrF-Gene von filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten wie z.B. der Gattungen *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus* bekannt.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, pyrF-Gene von  
20 filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten zur Verfügung zu stellen. Diese Gene eignen sich zur Verwendung als Selektionsmarkergene für die Transformation Uridin-auxotropher Stämme.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNS-Sequenz, die für ein Protein mit Enzymaktivität der Orotsäure-Phosphoribosyltransferase (pyrF-Aktivität) kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie die chromosomale DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 1133 bis einschließlich Position 1877 umfaßt oder die cDNS-  
30 Sequenz SEQ ID NO:2 ab Position 1 bis einschließlich Position 684 umfaßt oder eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 60 % zu der DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 umfaßt.

- 35 Bevorzugt ist eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie grö-

ßer als 70 % zu der DNS-Sequenz SEQ ID NO:2.

In einer besonders bevorzugten Ausführung umfaßt die vorliegende Erfindung eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 80 % zu der DNS-Sequenz SEQ ID NO:2.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Computerprogramm "Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin" erhalten werden. Die Homologiebestimmung erfolgt durch eine Suche in der Datenbank mit dem Unterprogramm "blast" und den voreingestellten Werten (Trefferhäufigkeit 10,0). Die ähnlichsten Sequenzen werden dann mit dem Unterprogramm "gap" auf Homologie untersucht. Hierbei werden die voreingestellten Parameter "gap creation penalty 50" und "gap extension penalty 3" verwendet, um DNS-Sequenzen zu vergleichen. Um Aminosäuresequenzen zu vergleichen, werden die voreingestellten Parameter „gap weight 8" und „length weight 2" verwendet.

20

Die erfindungsgemäße DNS Sequenz SEQ ID NO:1 von Position 1133 bis einschließlich Position 1225 und ab Position 1287 bis einschließlich Position 1877, bzw. die davon abgeleitete cDNS-Sequenz SEQ ID NO:2 von Position 1 bis einschließlich Position 684 kodiert für ein Protein mit pyrF-Aktivität.

25

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Protein mit pyrF-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 umfaßt oder eine Aminosäuresequenz mit einer Sequenzhomologie größer 60 % zur Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3 umfaßt.

30

Bevorzugt ist eine Aminosäuresequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 70 % zu der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3.

35

Insbesondere bevorzugt in der vorliegenden Erfindung ist eine Aminosäuresequenz mit einer Sequenzhomologie größer 80 % zu der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3.

- 5 Die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 1226 bis einschließlich Position 1286 ist ein Intron, das nicht in Aminosäuresequenz translatiert wird.

Die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 gibt von Position 1 bis Position  
10 1132 die DNS Sequenz für die Promotorregion zur Transkription des pyrF-Gens aus *Trametes versicolor* wieder. Diese Promotorsequenz läßt sich gegen beliebige andere Promotorsequenzen zur Transkription austauschen.

- 15 Die erfindungsgemäße DNS-Sequenz läßt sich beispielsweise durch Klonierung aus dem Basidiomycetenstamm *Trametes versicolor* TV-1 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11523) erhalten. Dazu wird mittels an sich bekannter Methoden eine Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 erstellt. Es kann  
20 sich dabei um eine cDNS- oder um eine genomische Genbank handeln.

Zur Isolierung der erfindungsgemäßen DNS-Sequenz in der Genbank  
25 werden DNS-Sonden verwendet, die pyrF-spezifische DNS-Sequenzen enthalten. Solche DNS-Sonden lassen sich beispielsweise mittels PCR-Reaktion unter Verwendung von DNS-Primern aus genomischer DNS von *Trametes versicolor* TV-1 gewinnen.

- 30 Als Primer werden degenerierte DNS Abschnitte einer Länge von vorzugsweise 23 bis 26 bp verwendet, deren Sequenz durch Sequenzvergleich bekannter pyrF-Gene festgelegt wird. Die als Primer geeigneten DNS-Abschnitte erhält man vorzugsweise durch Oligonukleotidsynthese der festgelegten DNS-Abschnitte. Die I-  
35 solation eines erfindungsgemäßen pyrF-Gens kann beispielsweise

wie in den Beispielen 1 bis 3 beschrieben erfolgen.

Ein beispielsweise derart isoliertes pyrF-Gen läßt sich mittels dem Fachmann bekannten Techniken wie beispielsweise der site  
5 directed Mutagenese an jeweils gewünschter Position der Sequenz modifizieren. Daher ist auch eine DNS-Sequenz kodierend für ein Protein mit pyrF-Aktivität umfassend eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 60 %, bevorzugt 70 %, besonders bevorzugt 80% zu der DNS-Sequenz SEQ ID NO:2 ab Position 1 bis  
10 einschließlich Position 684 von der Erfindung umfasst.

Zur Expression der erfindungsgemäßen DNS wird diese in an sich bekannter Art und Weise in einem Expressionsvektor kloniert, dieser das pyrF-Gen enthaltende Expressionsvektor in einen Mikroorganismus eingebracht und in dem Mikroorganismus exprimiert.  
15

Die Erfindung betrifft daher auch einen Expressionsvektor der dadurch gekennzeichnet ist, daß er ein erfindungsgemäßes pyrF-Gen enthält.

20

Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren eignen sich insbesondere zur Expression von Genen die für Proteine kodieren in einem Wirtsorganismus der Gattung Trametes, Coriolus und Polyporus. Unter Genen die für Proteine kodieren sind im Sinne der  
25 Erfindung auch die von den Strukturgenen abgeleiteten cDNS-Gene der Proteine zu verstehen. Bei den Proteinen kann es sich um für den Wirtsorganismus heterologe Proteine oder um für den Wirtsorganismus homologe Proteine handeln.

30 Der erfindungsgemäße Expressionsvektor enthält somit vorzugsweise auch mindestens ein Gen, das für ein zu exprimierendes Protein kodiert.

Besonders bevorzugt enthält der erfindungsgemäße Expressionsvektor mindestens ein Gen, das für ein hydrolytisches Enzym  
35

z.B. aus der Gruppe der Cellulasen, Hemicellulasen und Lipasen oder aus der Gruppe der Oxidoreduktasen wie z.B. den Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Laccasen, Cellobiose-Chinon-Oxidoreduktase oder Cellobiose-Oxidase kodiert.

5

Insbesondere bevorzugt enthält der erfindungsgemäße Expressionsvektor ein Gen für eine Laccase.

Bei dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor kann es sich um ein  
10 DNS-Konstrukt handeln, das in das Genom des Wirtsorganismus integriert und zusammen mit diesem repliziert wird. Alternativ kann es sich bei dem Expressionsvektor um ein autonom replizierendes DNS-Konstrukt handeln, das nicht in das Wirtsgenom integriert, wie z.B. ein Plasmid, ein artifizielles Chromosom  
15 oder ein vergleichbares extrachromosomales genetisches Element.

Ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor sollte vorzugsweise auch folgende genetische Elemente enthalten:

20 Einen Promotor, der die Expression eines proteinkodierenden Gens in dem Wirtsorganismus vermittelt. Es sollte sich dabei vorzugsweise um einen starken Promotor handeln, damit eine hohe Expressionsleistung gewährleistet werden kann. Der Promotor ist vorzugsweise funktionell mit dem 5'-Ende des zu exprimierenden  
25 Gens verknüpft. Der Promotor kann von dem zu exprimierenden Gen stammen oder es kann auch der Promotor eines fremden Gens verwendet werden.

Vorzugsweise geeignete Promotoren sind ausgewählt aus der Gruppe  
30 der in filamentösen Pilzen der Klasse der Basidiomyceten aktiven Promotoren wie z. B. der GAPDH-Promotor aus *Trametes versicolor*, Promotoren für Laccasegene aus *Trametes versicolor* oder *Polyporus pinsitus*, der Promotor für das Ornithin-Transcarbamoylasegen oder das GAPDH-Gen aus *Coriolus hirsutus*  
35 oder der GAPDH-Promotor aus *Agaricus bisporus*.



Besonders bevorzugt ist der GAPDH-Promoter aus *Trametes versicolor*. Dieser Promotor ist in DE-A-19814853 Beispiel 5 und DE-A-19814853, SEQ ID NO: 3, Base 1 - 1542 offenbart.

5

Ferner sollten vorzugsweise für den Wirtsorganismus passende Signale für die Transkriptionstermination und in Eukaryonten zusätzlich Signale für die Polyadenylierung in dem Expressionsvektor enthalten und funktionell mit dem 3'-Ende des zu exprimierenden Gens verknüpft sein. Solche Signale für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung sind z.B. in SEQ ID NO:1, bp 1878 - 3448 gezeigt.

Als Transkriptionsterminator kann der Terminator des zu exprimierenden proteinkodierenden Gens verwendet werden oder aber der Terminator eines fremden Gens. Bevorzugt wird der Transkriptionsterminator aus dem Gen einer Laccase verwendet.

Die Expression der Proteine kann intrazellulär oder in Gegenwart einer funktionsfähigen Signalsequenz, zum Zweck der Sekretion, auch extrazellulär erfolgen.

Falls die Sekretion des exprimierten Proteins aus der Zelle erwünscht ist, enthält der erfindungsgemäße Expressionsvektor vorzugsweise eine funktionstüchtige Signalsequenz 5' vor dem proteinkodierenden Gen. Darüberhinaus kann auch ein sogenannter Sekretionscarrier, funktionell mit dem 5'-Ende des proteinkodierenden Gens verknüpft, in dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthalten sein.

30

Bei dem Sekretionscarrier kann es sich um das Gen für ein sekretiertes Protein oder um das Fragment eines Gens für ein sekretiertes Protein handeln. Der Sekretionscarrier kann mit dem zu sekretierenden Protein funktionell so verknüpft sein, daß ein Fusionsprotein aus Sekretionscarrier und dem zu sekre-

35

- tierenden Protein entsteht. In einer anderen Ausführung ist die Verknüpfung von Sekretionscarrier und dem zu sekretierenden Protein so gestaltet, daß der Sekretionscarrier von dem zu sekretierenden Protein getrennt werden kann. Dies kann beispielsweise bewerkstelligt werden durch Einfügung einer Erkennungssequenz für ein proteinspaltendes Enzym in die Verknüpfungsstelle zwischen Sekretionscarrier und zu sekretierendem Protein. Als Beispiel hierfür sei genannt die Lysin-Arginin Erkennungssequenz für die sogenannte KEX2-Protease und als Beispiel für einen Sekretionscarrier die Glucoamylase aus *Aspergillus niger* (Contreras et al., *Bio/Technology* (1991) 9, 378 - 381, Broekhuijsen et al., *J. of Biotechnology* (1993) 31, 135 - 145).
- 15 DNS-Sequenzen, die anders als Transkriptionsterminatoren am 3'-Ende des proteinkodierenden Gens an der Expression und Sekretion des exprimierten Gens beteiligt sind, können ebenfalls in dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthalten sein. Ein Beispiel dafür liefert das Gen für die Laccase aus *Neurospora crassa*, dessen 3'-Ende die Sequenz für 13 Aminosäuren enthält, die während der Sekretion des Proteins entfernt werden und im reifen Protein nicht mehr enthalten sind (Germann et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 885 - 896).
- 20 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren erfolgt mittels im Stand der Technik bekannter Verfahren. Verschiedene Möglichkeiten sind in den Beispielen dargelegt. Die dort beschriebenen Verfahren lassen sich vom Fachmann auf beliebige andere Vektoren, Resistenzgene, Regulationselemente und
- 30 Strukturgene anwenden.

Die Erfindung betrifft ferner Mikroorganismen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthalten.

Geeignete Mikroorganismen zur Expression eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors sind Stämme filamentöser Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten.

- 5 Besonders geeignet sind Stämme aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus*.

Besonders bevorzugte Wirtsorganismen sind monokaryontische Stämme aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus*.

10

Insbesondere bevorzugt sind Wirtsorganismen der Art *Trametes versicolor*.

15

Der Wirtsorganismus zeichnet sich vorzugsweise dadurch aus, daß er einen genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus (Auxotrophie) besitzt, aufgrund dessen der essentielle Stoffwechselmetabolit Uridin nicht mehr synthetisiert werden kann und der Wirtsorganismus auf Minimalmedien ohne Zusatz dieses Stoffwechselmetaboliten nicht mehr zum Wachstum befähigt ist.

20

Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren erlauben die Selektion positiver Transformanten aufgrund Komplementation eines auxotrophen Gendefekts im Wirtsorganismus bei Transformation von Pilzen ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und

25 *Polyporus*.

Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren eignen sich zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind.

30

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizienten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind.

35 Dieses Verfahren, bei dem ein Pilz mit einem auxotrophen Gen-

defekt als Wirtsstamm mittels an sich bekannter Verfahrensschritte mit einem Expressionsvektor, der ein Gen zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm besitzt, in einem Transformationsansatz transformiert wird und aus dem

5 Transformationsansatz mit dem Expressionsvektor transformierte Klone durch Selektion auf Komplementation des auxotrophen Gendefekts ausgewählt werden, wobei die Expression des Gens zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm durch ein genetisches Regulationselement kontrolliert wird, das im  
10 Wirtsstamm aktiv ist, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsstamm ein Uridin-auxotropher Pilz ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus* mit einem Gendefekt im *pyrF* Gen eingesetzt wird.

15 Bevorzugt als Wirt für die Genexpression ist ein monokaryontischer Basidiomycet aus der Gattung *Trametes*, *Coriolus* oder *Polyporus*.

Insbesondere bevorzugt für die Genexpression ist ein Wirt der  
20 Art *Trametes versicolor*, der einen Defekt im *pyrF* Gen hat und für Uridin auxotroph ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Expressionssystem umfassend einen Wirtsstamm ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus*  
25 und *Polyporus* mit einem genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus aufgrund dessen der für das Wachstum essentielle Stoffwechselmetabolit Uridin nicht mehr synthetisiert werden kann und der Wirtsstamm auf Minimalmedien ohne Zusatz dieses Stoffwechselmetaboliten nicht mehr zum Wachstum befähigt ist  
30 sowie einen Expressionsvektor enthaltend ein Selektionsmarker-gen, welches den auxotrophen Gendefekt des Wirtsstammes komplementiert, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsstamm als genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus einen Defekt im *pyrF* Gen besitzt, und das Selektionsmarker-gen ein *pyrF* Gen ist.

Das pyrF Gen stammt bevorzugt aus einem Pilz der Gattung Agaricus, Coriolus, Polyporus, Pleurotus, Phanerochaete, Schizophyllum oder Trametes.

5 Insbesondere geeignet als Selektionsmarkergen für das erfindungsgemäße Expressionssystem ist das Orotsäure-Phosphoribosyltransferasegen (pyrF Gen) aus einem filamentösen Pilz der Klasse der Basidiomyceten Trametes versicolor.

10 Bevorzugt geeignet für die Expression des pyrF Gens sind die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren.

Vorzugsweise wird die Expression des pyrF Gens aus dem Basidiomyceten Trametes versicolor vom Promotor und ggf. Terminator  
15 für das pyrF Gen aus Trametes versicolor reguliert.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem eignet sich insbesondere zur Expression eines Gens, das für ein hydrolytisches Enzym z.B. aus der Gruppe der Proteasen, Cellulasen, Hemicellulasen  
20 und Lipasen oder aus der Gruppe der Oxidoreduktasen wie z. B. den Ligninperoxidasen, Manganperoxidasen, Laccasen, Cellobiose-Chinon-Oxidoreduktase oder Cellobiose-Oxidase kodiert.

Insbesondere bevorzugt eignet es sich zur Expression eines Gens  
25 für eine Laccase.

Die Transformation des Wirtsstammes erfolgt nach Methoden, die dem Stand der Technik entsprechen. Zu diesen Methoden gehören die Transformation von Protoplasten nach der  $\text{CaCl}_2$ /PEG-Methode,  
30 die Transformation durch Elektroporation oder die biolistische Transformation durch Beschuß mit DNS-haltigen Mikroprojektilen. Diese Verfahren sind in Standardlehrbüchern beschrieben.

Beispielsweise wird das zu transformierende Gen in bekannter  
35 Art und Weise in einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor klon-

niert und mittels der genannten Methoden in einen filamentösen Pilz ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus* eingebracht.

5 Das zu transformierende Gen kann aber auch in einen Expressionsvektor ohne Selektionsmarker gen kloniert werden und zusammen mit einem den auxotrophen Gendefekt des Wirtsstammes komplementierenden Vektor zur Erzeugung von Transformanten verwendet werden (Cotransformation).

10

Der für die Transformation zu verwendende Stamm ist ein Uridin-auxotropher filamentöser Pilz ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus*. Bei dem betreffenden Stamm aus der Klasse der Basidiomyceten kann es sich um einen monokaryontischen oder aber auch um einen dikaryontischen Stamm handeln.  
15 In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich um einen Uridin-auxotrophen Stamm, der einen Defekt im *pyrF* Gen hat.

Besonders bevorzugt für die Transformation ist ein monokaryontischer, Uridin-auxotropher, *pyrF* defizienter Stamm aus der Art *Trametes versicolor*.  
20

Die Selektion positiver Transformanten erfolgt beispielsweise, indem Protoplasten nach der Transformation mit Vektor DNS auf einem Medium ausgebracht werden, welchem zur osmotischen Stabilisierung der Protoplasten ein Zusatz wie z. B. Sorbitol, Mannitol oder Saccharose beigelegt ist und welches die Selektion von Transformanten mit dem komplementierenden *pyrF*- Gen erlaubt.  
25

30

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird in einem homologen System der filamentöse Pilz *Trametes versicolor* mit dem Gen einer Laccase aus *Trametes versicolor* transformiert. Dadurch wird eine Steigerung der Expressionsrate für die besagte Laccase erzielt, die die nach dem Stand der Technik erzielbare  
35

Produktionsrate in der Fermentation von 0,1 g Laccase/l Kulturmedium signifikant verbessert.

Vorzugsweise verwendet man dazu den Promotor, der dem Laccasegen eigen ist oder den Promotor für ein stark exprimiertes Gen aus *Trametes versicolor*. Vorzugsweise verwendet man die Promotoren der Laccasegene I und III, deren Isolierung und Verwendung in DE-A-19814853 offenbart ist. Den Promotor eines weiteren stark exprimierten Gens stellt der GAPDH Promotor für die Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Trametes versicolor* dar.

Vorzugsweise verwendet man Selektionsmedien, auf denen nur solche Transformanten von *Trametes versicolor* wachsen können, die mit einem funktionell exprimierten Selektionsmarkergen für das *pyrF*-Gen transformiert worden waren. Bevorzugt handelt es sich um ein im 6. Beispiel beschriebenes Minimalmedium in Abwesenheit von Uridin, auf dem *pyrF* auxotrophe Stämme von *Trametes versicolor* nicht mehr wachsen können, bzw. erst nach Zusatz von Uridin wieder wachsen können.

Die erfolgreiche Anwendung eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors enthaltend das *pyrF* Gen als Selektionssystem ist abhängig von der effizienten Expression des Selektionsmarkergens in *Trametes* Transformanten. Für eine effiziente Expression sind entsprechende Expressionssignale notwendig.

In *Trametes versicolor* bewirken Expressionssignale aus Basidiomyceten mit überraschenderweise erheblich höherer Effizienz eine funktionelle Expression als die anderweitig verfügbaren Expressionssignale aus Ascomyceten. Deshalb stehen bei den erfindungsgemäßen DNS Vektoren das *pyrF* Selektionsmarkergen vorzugsweise unter der Kontrolle von genetischen Regulationselementen aus Basidiomyceten, insbesondere bevorzugt von solchen ausgewählt aus den Gattungen *Trametes*, *Coriolus* und *Polyporus*.

Vorzugsweise steht das pyrF Gen unter der Kontrolle der ihm vorgeschalteten 5'-Promotorregion sowie der ihm nachgeschalteten 3'-Terminatorregion. Ein solches DNS-Fragment, bei dem  
5 das pyrF Gen aus *Trametes versicolor* unter Kontrolle der Expressionssignale des pyrF Gens aus *Trametes versicolor* steht, beschreibt SEQ ID NO:1.

Weiternin kann das pyrF Gen unter der Kontrolle von Expressionssignalen aus Basidiomyceten stehen, die verschieden von denen des pyrF Gens sind. Zu den Expressionssignalen, die diese Funktion erfüllen, gehören GAPDH-Promotoren filamentöser Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten, wie z.B. *Coriolus hirsutus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus bisporus* oder *Trametes*  
15 *versicolor*, der OCT-Promotor aus *Coriolus hirsutus*, der Promotor der Laccase I oder der Laccase III aus *Trametes versicolor* sowie der Terminator des GAPDH-Gens aus *Agaricus bisporus* oder die Terminatoren des Laccase I, bzw. Laccase III Gens aus *Trametes versicolor*.

20

Besonders bevorzugt ist ein Vektor, bei dem das pyrF Gen aus *Trametes versicolor* unter Kontrolle der Expressionssignale des GAPDH Gens aus *Trametes versicolor* steht. Ein solcher Vektor ist im 4. Beispiel beschrieben.

25

Insbesondere bevorzugt ist ein Vektor, bei dem das pyrF Gen aus *Trametes versicolor* unter Kontrolle der Expressionssignale des pyrF Gens aus *Trametes versicolor* steht. Ein solcher Vektor ist im 3. Beispiel beschrieben.

30

Das pyrF Gen kann jedes Gen sein, das für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Orotsäure-Phosphoribosyltransferase kodiert.

35 Bevorzugt stammt das pyrF Gen aus einem filamentösen Pilz aus



der Klasse der Basidiomyceten, wie z.B. *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus hirsutus*, *Polyporus pinsitus*, *Schizophyllum commune* oder *Trametes versicolor*.

5 Besonders bevorzugt ist das *pyrF* Gen aus *Trametes versicolor*.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das erfindungsgemäße Expressionssystem enthaltend ein das Protein kodierendes Gen in an sich bekannter Weise zur Proteinproduktion  
10 eingesetzt wird oder daß ein Pilzstamm enthaltend ein das Protein kodierendes Gen, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurde, in an sich bekannter Art und Weise kultiviert wird.

15

Solche Herstellungsverfahren sind prinzipiell beispielsweise bekannt aus Eggert et al., Appl. Environ. Microbiol (1996) 62, 1151 - 1158, Martinez et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (1994) 41, 500 - 504, oder WO 93/08272.

20

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Die in den Beispielen verwendeten Standardmethoden zur Behandlung von DNS oder RNS, wie die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, DNS Polymerasen, Reverser Transkriptase etc.  
25 sowie die Standardverfahren wie Transformation von Bakterien, Southern und Northern Analyse, DNS Sequenzierung, radioaktive Markierung, Screening und PCR-Technologie wurden, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt wie vom Hersteller empfohlen oder wenn keine Herstelleranleitung vorhanden war entsprechend  
30 dem aus den Standardlehrbüchern bekannten Stand der Technik.

### **1. Beispiel**

#### **Isolierung einer *pyrF*-spezifischen DNS Sonde**

Eine DNS-Sonde zur Isolierung eines *pyrF*-Gens wurde durch PCR-  
35 Amplifikation aus *T. versicolor* genomischer DNS mit degene-

rierten Primern erzeugt. Die degenerierten Primer wurden anhand eines Sequenzvergleichs bekannter pyrF-Gene konstruiert. Gene für die Orotsäure Phosphoribosyltransferase (bezeichnet als pyrF Gene oder, in einer anderen Nomenklatur bezeichnet als ura5 Gene) wurden in den folgenden Gendatenbanken gesucht: a) swissprot, b) sptrembl, c) pir, d) embl, e) genbank, f) em\_tags, g) gb\_tagsEMBL. Ura5, bzw. pyrF Gene folgender Organismen wurden für den Sequenzvergleich ausgewählt: *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Rhizomucor circinelloides*, *Colletotrichum graminicola*, *Trichoderma reesei* und *Sordaria macrospora*. Die Aminosäuresequenzen der genannten pyrF Gene wurden verglichen. Durch den Sequenzvergleich konnten drei Peptide mit einer Länge von 6 bis 9 Aminosäuren identifiziert werden, die in allen pyrF-Proteinen vollständig konserviert waren. Zwei dieser Peptide wurden unter Berücksichtigung degenerierter Codons in DNS zurück übersetzt, um degenerierte Primer herzustellen. Die Primer hatten die folgenden Sequenzen (die Abkürzung I bezeichnet die Base Inosin):

20 Primer A: 5'-TTYGGICCCIGCITAYAARGGIATHCC-3' SEQ ID NO:4  
Primer B: 5'-TTICCCICCYTCICCRTGRTCYTT-3' SEQ ID NO:5

PCR-Amplifikationen wurden entsprechend dem Stand der Technik nach den Angaben des Herstellers (PCR Kit von Qiagen, Hilden) durchgeführt: Eine 50 µl PCR Reaktion enthielt 100 ng chromosomaler *T. versicolor* DNS (isoliert wie im 2. Beispiel beschrieben), den vom Hersteller bereitgestellten Puffer und darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM der vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und jeweils 100 pmol der Primer A und B. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 4 min bei 94°C, gefolgt von 10 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 45°C und 1 min bei 65°C sowie 30 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 1 min bei 72°C. Es wurde ein PCR-Produkt von ca. 140 bp erhalten. Das PCR-Produkt wurde durch Agarose Gelelektrophorese

gereinigt, in den pCR-Script Vektor (Klonierkit von Stratagene, Heidelberg) kloniert und in *E. coli* transformiert. Aus der Anzucht transformierter *E. coli* wurde das Plasmid isoliert. Eine DNS-Sequenzanalyse vom 5'- und 3'-Ende bestätigte, daß es sich bei dem klonierten DNS-Fragment um das Fragment eines *pyrF*-Gens handelte.

Zur Vorbereitung der DNS-Sonde für das Screening von *pyrF*-Genen wurde das *pyrF*-spezifische PCR-Fragment durch Behandlung mit Not I und Eco RI ausgeschnitten, über Agarose Elektrophorese isoliert und mit dem nicht-radioaktiven „Gene Images“ Detektionsskit der Fa. Amersham, Braunschweig markiert.

## 2. Beispiel

### Herstellung einer chromosomalen Genbank aus *Trametes versicolor*.

Es wurde der Stamm *Trametes versicolor* TV-1 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11523) verwendet. Mycel von *Trametes versicolor* wurde zuerst durch Anzucht für 7 Tage bei 28°C auf Malzagarplatten (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, 1,5 % Agar-Agar, pH 5,0) gewonnen. Von den Malzagarplatten wurden drei Stücke ausgestanzt und damit 100 ml steriles Malzextrakt Medium (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, pH 5,0) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 100 rpm für 7 Tage bei 28°C inkubiert. Die auf diese Weise hergestellte Mycelsuspension wurde über eine Porzellannutsche abgesaugt und mit 0,9 % Saline gewaschen. 1 g Mycel von *T. versicolor* wurden in Gegenwart von flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in einem sterilen Probengefäß aufgenommen und sofort mit 5 ml Extraktionslösung (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA, 0,25 M NaCl, 0,6 mg/ml Proteinase K) und 0,5 ml einer 10 % (w/v) Natriumlauroylsarcosinlösung versetzt. Nach Incubation bei 50°C für mindes-

tens 2 h wurde das Gemisch mit 0,85 ml 5 M NaCl und 0,7 ml einer 10 % (w/v) CTAB-Lösung in 0,7 M NaCl versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (24:1) wurde der Ansatz ausgeschüttelt, die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt, die wässrige Phase entfernt und chromosomale DNS durch Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Die weitere Reinigung der gefällten DNS erfolgte anschließend über eine Säule (Qiagen Genomic Tip). Auf diese Weise konnten aus 16 g Mycel 0,5 mg chromosomale DNS isoliert werden.

Zur Herstellung der chromosomalen Genbank wurden 90 µg chromosomale DNS von *Trametes versicolor* TV-1 in einem Partialverdau mit Sau 3A geschnitten und durch Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Die chromosomalen DNS-Fragmente wurden im Größenbereich von 5 - 20 kb und größer 20 kb isoliert und jeweils in mit Bam HI vorgeschchnittene Lambda-Phagen kloniert („Lambda Zap<sup>®</sup> Express“ Klonierungssystem von Stratagene). Von der 5 - 20 kb DNS-Fraktion wurden  $4 \times 10^4$  Phagen/µg Vektor-DNS und von der DNS-Fraktion größer 20 kb wurden  $5 \times 10^4$  Phagen/µg Vektor-DNS erhalten. Die Phagen wurden durch Infektion des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRF' amplifiziert.

### 3. Beispiel

#### Isolierung des *pyrF*-Gens.

Es wurde die im 2. Beispiel beschriebene chromosomale Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 verwendet. Das Screening nach dem genomischen *pyrF*-Gen wurde nach dem Stand der Technik durchgeführt. In einer ersten Screeningrunde wurden Zellen von *E. coli* XL-1 Blue MRF' auf 10 Petrieschalen zuerst kultiviert und dann mit 50000 Phagen der chromosomalen Genbank (5 - 20 kb Fraktion, siehe 2. Beispiel) pro Petrieschale infiziert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die neu gebildeten Phagen auf Nylonfilter (Stratagene) transferiert. Die Filter wurden dann entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit der

nicht-radioaktiv markierten pyrF-spezifischen Sonde (siehe 1. Beispiel) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 60°C. Positive Klone wurden gepickt und durch Wiederholung des Screeningverfahrens gereinigt. Nach drei Runden der Vereinzelung wurden bei dem Screening 6 stark hybridisierende Phagenklone isoliert, die nach einer Vorschrift des Herstellers (Stratagene) durch "in vivo excision" in den pBK CMV Vektor (Stratagene) umklontiert wurden. Analyse der Klone durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen und PCR zeigte, daß es sich bei allen Klonen um pyrF-Gene handelte. Nach Sequenzanalyse von drei Klonen wurde vom längsten der pyrF-Klone ca. 3,4 kb Sequenzinformation ermittelt. Dieser pyrF-Klon erhielt die Bezeichnung pyrF61 (SEQ ID NO: 1). Der Klon pyrF61 enthielt Sequenzinformation für das pyrF-Strukturgen (kodierender Bereich, SEQ ID NO: 1, bp 1133 - 1877). Der kodierende Sequenzbereich enthielt zusätzlich ein Intron (SEQ ID NO: 1, bp 1226 - 1286), das nicht in Aminosäuresequenz translatiert wird. Das entsprechende pyrF cDNS-Gen ist in SEQ ID NO: 2 angegeben. Das in Klon pyrF61 enthaltene pyrF-Strukturgen, ohne die Intronsequenz, kodiert für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 3 angegebenen Aminosäuresequenz.

Daneben enthielt Klon pyrF61 auch Sequenzinformation in der Region 5' vor dem ATG-Startkodon (Promotorbereich, SEQ ID No: 1, bp 1 - 1132) sowie Sequenzinformation in der Region 3' nach dem Stopkodon (Terminatorbereich, SEQ ID No: 1, bp 1878 - 3448). Es handelt sich hierbei um neue genetische Regulationselemente für *Trametes versicolor*, die für die Herstellung von Expressionsvektoren zur Genexpression in filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten verwendet werden können.

#### 4. Beispiel

**Funktionelle Verknüpfung des *Trametes versicolor* GAPDH-Promotors mit dem pyrF-Gen aus *Trametes versicolor***

**A: Klonieren des pyrF-Gens in den pBluescript Vektor**

Für die weitere Bearbeitung wurde das pyrF-Gen aus pyrF61 in den Vektor pBluescript umkloniert. Dazu wurde das pyrF-Gen als 1,6 kb Sac I - Spe I Fragment aus dem im 3. Beispiel erhaltenen Klon pyrF61 isoliert und in den mit Sac I und Spe I vor-  
5 geschnittenen pBluescript Vektor subkloniert. Das dabei entstandene 4,6 kb Plasmid wurde pPyrF1 genannt.

**B: Einbau eines Linkers in pPyrF1 für die funktionelle Verknüpfung des ATG Translationsstartkodons des pyrF-Gens mit dem  
10 GAPDH-Promotor**

Vektor pPyrF1 wurde mit Sac I geschnitten, der linearisierte, 4,6 kb große Vektor durch Agarose Gelelektrophorese isoliert und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der auf diese Weise vorbereitete Vektor wurde mit den  
15 Linkeroligonukleotiden PyF-1 (SEQ ID NO:6) und PyF-2 (SEQ ID NO:7) ligiert. PyF-1 und PyF-2 hatten die folgende Sequenz:

Oligo PyF-1:

5'-CTAGACATGTCGCTCGAAAAATACCAGACAGAGCT-3' SEQ ID NO:6

20 Oligo PyF-2:

5'-CTGTCTGGTATTTTTCGAGCGACATGTCTAGAGCT-3' SEQ ID NO:7

In PyF-1 und PyF-2 ist die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BspLU11 I unterstrichen, die für die funktionelle  
25 Verknüpfung mit dem GAPDH-Promotor aus T. versicolor verwendet werden kann.

Ligationsansätze von Sac I geschnittenem pPyrF1 mit den Linkeroligos PyF-1 und PyF-2 wurden in E. coli Top 10F'-Zellen transformiert. Positive Klone enthielten eine neu eingeführte  
30 BspLU11 I Schnittstelle (neben zwei bereits in pPyrF1 enthaltenen). Die richtige Orientierung des eingebauten Linkers, bei der am Start-ATG Kodon des pyrF-Gens eine BspLU11 I Schnittstelle eingeführt worden war, wurde durch DNS-Sequenzanalyse  
35 bestimmt. Der auf diese Weise hergestellte Vektor (ca. 4,5 kb

Größe) erhielt die Bezeichnung pPyrF2.

**C: Einbau des T. versicolor GAPDH-Promotors in den pUC19 Vektor**

Die DNS-Sequenz des Promotors für das T. versicolor GAPDH-Gen ist in DE-A-19814853, SEQ ID NO:3, bp 1 - 1542 offenbart. Ein ca. 1 kb großes Promotorfragment des GAPDH-Gens wurde als Sph I Fragment isoliert und in einen pUC19 Vektor kloniert. Nach Analyse durch Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen Eco RI (im Polylinker von pUC19 enthalten) und BspLU11 I (im GAPDH-Promoterfragment enthalten) wurde ein Klon ausgewählt, in dem die BspLU11 I Schnittstelle der Eco RI Schnittstelle benachbart war. Der auf diese Weise hergestellte 3,7 kb große Vektor erhielt die Bezeichnung pTVgap (Fig. 1).

Aus dem für die Herstellung von pTVgap verwendeten pUC19 Vektor war vorher eine singuläre BspLU11 I Schnittstelle entfernt worden, die bei der weiteren Vektorkonstruktion störend gewesen wäre. Dies erfolgte, indem der pUC19 Vektor mit BspLU11 I geschnitten und der dadurch linearisierte Vektor mit Klenow DNA-Polymerase behandelt wurde. Dadurch wurden die nach dem BspLU11 I Verdau versetzten Enden des pUC19 Vektors aufgefüllt. Anschließend Ligation und Transformation von E. coli Top 10F' ergab Klone, die einen modifizierten pUC19 Vektor ohne BspLU11 I Schnittstelle enthielten.

25

**D: Funktionelle Verknüpfung des GAPDH-Promotors mit dem pyrF-Gen**

Der Vektor pTVgap wurde mit BspLU11 I und Eco RI geschnitten, das dabei entstandene 3,7 kb große Vektorfragment durch Agarose Gelelektrophorese isoliert und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Aus dem Vektor pPyrF2 wurde das pyrF Gen als 1,6 kb großes BspLU11 I - Eco RI Fragment isoliert. Dazu wurde pPyrF2 zuerst partial mit BspLU11 I geschnitten und das 4,6 kb große, linea-

35

risierte Vektorfragment durch Agarose Gelelektrophorese isoliert. Das isolierte 4,6 kb Fragment wurde anschließend mit Eco RI nachgeschnitten. Dabei entstand das gewünschte 1,6 kb pyrF Genfragment, das durch Agarose Gelelektrophorese isoliert wurde.

Das 3,7 kb große BspLU11 I - Eco RI Vektorfragment aus pTVgap und das 1,6 kb großes BspLU11 I - Eco RI Fragment aus pPyrF2 wurden ligiert und mit dem Ligationsansatz E. coli Top 10F<sup>+</sup> Zellen transformiert. Klone, bei denen das pyrF Gen über die BspLU11 I Schnittstelle funktionell mit dem GAPDH-Promotor verknüpft worden war, wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Durch DNS-Sequenzierung wurde die korrekte Verknüpfung des GAPDH-Promotors mit dem Start-ATG Kodon des pyrF Gens bestätigt. Der korrekte Klon hatte eine Größe von 5,3 kb und erhielt die Bezeichnung pPyrFgap (Fig. 2).

### 5. Beispiel:

#### Herstellung von Trametes Protoplasten und Regenerierung von Pilzkolonien

Für die Gewinnung von Protoplasten verwendet wurden die dikaryotischen Stämme Trametes versicolor TV-1, Trametes versicolor 38070 (erhältlich von American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852 USA) und der monokaryotische Stamm Trametes versicolor F2 100 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11972). Mycel von Trametes versicolor wurde zuerst durch Anzucht für 7 Tage bei 28°C auf Malzagarplatten (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, 1,5 % Agar-Agar, pH 5,0) gewonnen. Von den Malzagarplatten wurden drei Stücke ausgestanzt und damit 100 ml steriles Malzextrakt Medium (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, pH 5,0) in 500 ml Erlenmeyerkelben, bzw. 125 ml des sterilen Mediums in 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäßen, angeimpft. Die Kultur wurde ohne Schütteln für 7 Tage bei 28°C inkubiert, bis die Kulturflüssig-



keit dicht mit einer Mycelmatte bewachsen war. Die Kulturflüssigkeit wurde dekantiert und frisches Medium zugegeben (30 ml für das Mycel einer 100 ml Anzucht). Das Mycel wurde mit einem Ultra Turrax (9500 rpm, 4 min) homogenisiert und unter Schütteln bei 100 rpm für weitere 18 h bei 28°C inkubiert.

Die auf diese Weise hergestellte Mycelsuspension wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm (2000 x g) geerntet und das dabei erhaltene Mycel dreimal durch suspendieren mit 0,1 M  $\text{MgSO}_4$ , 0,6 M Saccharose, 0,1 M Phosphat, pH 5,8 (OMT-Medium) und anschließendes Zentrifugieren gewaschen. Das isolierte Mycel wurde gewogen und bis zur Behandlung mit lytischem Enzym bei 4°C aufbewahrt.

Protoplasten wurden folgendermaßen hergestellt: In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurde Mycelium eines Kolbens in 15 ml einer frisch hergestellten und sterilfiltrierten Lösung des lytischen Enzymgemisches Novozym 234 (3 mg/ml, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark) in OMT-Medium suspendiert. Das in der Enzymlösung resuspendierte Mycelium wurde bei geringer Drehzahl (80 rpm) auf einem Schüttelinkubator (Infors) für 1 bis 3 h bei 30°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Bildung der Protoplasten im Mikroskop beobachtet. Frei bewegliche Protoplasten waren üblicherweise nach 1 h zu sehen. Der Endpunkt der Protoplastierung wurde durch visuelle Inspektion im Mikroskop bestimmt und die Protoplasten durch Filtration über Glaswolle in einem Glasfilter von restlichem Mycelium abgetrennt. Die Glaswolle wurde sorgfältig mit eisgekühltem OMT-Medium gewaschen. Protoplasten wurden durch Zentrifugation der Suspension in einem sterilen Probengefäß isoliert (2000 rpm; 2500 x g, 4°C, 10 min). Die weitere Bearbeitung der Zellen erfolgte bei 4°C. Das Protoplastenpellet wurde durch suspendieren in OMT-Medium gewaschen und durch Zentrifugation reisoliert. Bei Bedarf wurde der Waschschrift wiederholt. Die Konzentration von Protoplasten wurde unter dem Mikroskop in einer Zählkammer be-

stimmt. Die Protoplastensuspension wurde für Experimente zur Protoplastenregenerierung oder für Transformationen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  Protoplasten/ml eingestellt.

5 Für Regenerierungsexperimente wurden von der Protoplasten-  
suspension Verdünnungsreihen hergestellt und auf Agarplatten  
ausplattiert, die 1,5 % Malzextrakt, 0,1 % Trypticase Pepton, 2  
% Glucose, 1,5 % Agar und zur osmotischen Stabilisierung 0,4 M  
10 Mannitol enthielten. Auf diese Weise wurde der Anteil an über-  
lebensfähigen Zellen bestimmt und getestet, ob die erhaltenen  
Protoplasten zu mycelartigem Wachstum regeneriert werden konn-  
ten. Auf die gleiche Weise wurde auf osmotisch nicht stabili-  
sierten Platten (ohne Mannitol) der Anteil an osmotisch stabi-  
len Zellen (z.B. Mycelfragmente) bestimmt. Nach Inkubation bei  
15 28°C für 7 Tage wurden die erhaltenen Kolonien gezählt. Der An-  
teil überlebensfähiger Zellen aus einer Reihe von Pro-  
toplastenpräparationen betrug ca. 0,5 %. Diese Ergebnisse zei-  
gen, daß von *Trametes versicolor* überlebensfähige und regene-  
rierbare Protoplasten für Transformationsexperimente her-  
20 gestellt werden können.

## 6. Beispiel

### Isolierung von Uridin-auxotrophen Mutanten von *Trametes versicolor*

25 Uridin-auxotrophe Mutanten von *Trametes versicolor* mit einem  
Gendefekt im Pyrimidin Stoffwechsel (pyr-Mutanten) wurden in  
Anlehnung des in Boeke et al., Methods Enzymol. (1987) 154, 164  
- 175 beschriebenen Verfahrens isoliert. Als selektives Agens  
wurde die genotoxische Substanz 5-Fluor-Orotsäure (FOA) verwen-  
30 det. Mutagenese von *Trametes versicolor* Protoplasten erfolgte  
durch UV-Behandlung.

#### A: UV-Mutagenese:

Für die Mutagenese verwendet wurde der im 5. Beispiel beschrie-  
35 bene monokaryontische Stamm *Trametes versicolor* F2 100. Proto-

plasten dieses Stammes wurden hergestellt wie im 5. Beispiel beschrieben.

Für die Mutagenese wurde als Quelle für UV-Licht ein BioRad UV-  
5 Linker (BioRad, München, Leistung 5,8 W/cm<sup>2</sup>, Abstand von der UV-  
Quelle 16 cm) verwendet. Die Zahl der für die Mutagenese ver-  
wendeten Protoplasten betrug  $8 \times 10^6$ . Protoplasten von *Trametes*  
*versicolor* wurden in einer Petrieschale vorgelegt und für ver-  
schieden lange Zeitabschnitte mit UV-Licht bestrahlt. Dabei  
10 stellte sich heraus, daß unter den beschriebenen Bedingungen  
eine Bestrahlung für 60 sec. optimal für die nachfolgende Se-  
lektion auxotropher Mutanten war.

**B: Selektion von Uridin auxotrophen Mutanten:**

15 Für die Selektion von Uridin auxotrophen Mutanten wurde folgen-  
des Minimalmedium (MM) verwendet:

	Glucose	20	g/l
	Agar	15	g/l
20	Kaliumdihydrogenphosphat	1	g/l
	Magnesiumsulfat	0,5	g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat	0,1	g/l
	Adenin	27,5	mg/l
	DL-Phenylalanin	0,15	g/l
25	L-Asparagin	2,5	g/l
	Thiamin	0,48	mg/l
	Calciumchlorid	10	mg/l
	Eisensulfat	10	mg/l
	Kupfersulfat	2	mg/l
30	Zinksulfat	1	mg/l
	Mangansulfat	1	mg/l

pH 5,0, mit Schwefelsäure eingestellt.

Für die osmotische Stabilisierung von Protoplasten wurde das  
35 MM-Medium mit 0,6 M Saccharose supplementiert (MMS-Medium). Für

Flüssiganzuchten wurde das MM-Medium ohne Agar hergestellt.

Zu Beginn wurde das MMS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen FOA sowie 10 mM Uridin supplementiert, um die Wachstumseigenschaften auf selektivem Medium für verschiedene Trame-  
 5 tesstämme zu charakterisieren. Es stellte sich heraus, daß MMS-Medium mit 1,5 mg/ml FOA und 10 mM Uridin (selektives MMS) das Wachstum der untersuchten Trametesstämme vollständig unterdrückte.

10

Platten mit selektivem MMS wurden mit UV-mutagenisierten Protoplasten (in Abschnitt A beschrieben) beimpft und 21 Tage bei 28°C inkubiert. Im Gegensatz zu nicht mutagenisierten Protoplasten wurde das Wachstum von 35 Kolonien beobachtet. Diese  
 15 potentiellen pyr-defizienten Mutanten wurden, um den Uridin auxotrophen Phänotyp näher zu charakterisieren, auf MM-Platten, MM-Platten mit 10 mM Uridin und selektiven MM-Platten ausgebracht und das Wachstum zum Ausgangsstamm F2 100 verglichen. Dabei zeigten von den 35 gepickten Kolonien 13 Trametesmutanten  
 20 eindeutig einen pyr-defizienten Phänotyp. Dies ist beispielhaft in der Tabelle 1 für den Wildtypstamm und drei Mutanten dargestellt.

#### **Tabelle 1**

25 **Wachstum von Trametes versicolor Mutanten auf verschiedenen MM-Medien**

Stamm	MM	MM + 10 mM Uridin	MM + 10 mM Uridin + 1,5 mg/ml FOA
F2 100	+	+	-
F2 100C2-1	-	+	+
F2 100C2-8	-	+	+
F2 100C4-13	-	+	+

**C: Identifizierung von pyrF-Mutanten**

Die Mutagenese mit FOA kann entweder zu Mutanten im gewünschten pyrF Gen (Orotsäure-Phosphoribosyltransferase) oder im pyrG Gen (Orotodin-5'-Phosphatdecarboxylase) führen. pyrG Mutanten und  
5 pyrF Mutanten wurden differenziert durch Transformation mit dem pyrF-Gen aus *Trametes versicolor*, dessen Isolierung im 3. Beispiel beschrieben wurde (Plasmid pyrF61). Parallel dazu wurden Uridin-auxotrophe *T. versicolor* Stämme auch mit dem Plasmid pPyrFgap transformiert (Herstellung siehe 4. Beispiel). Die  
10 Transformation von *Trametes versicolor* wird im 7. Beispiel beschrieben.

Bei 6 der 13 isolierten pyr-defizienten Mutanten konnten nach Transformation mit den Plasmiden pyrF61 und pPyrFgap Kolonien  
15 auf MM-Medium beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß diese sechs Mutanten defizient im pyrF Gen waren. Die drei Stämme F2 100C2-1, F2 100C2-8 und F2 100C4-13 ließen sich wiederholt mit der höchsten Häufigkeit transformieren und wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Ein Vergleich der  
20 Plasmide pyrF61 und pPyrFgap bezüglich der Transformationshäufigkeit ergab keine signifikanten Unterschiede, sodaß der pyrF-Promotor ausreichend für die Isolierung von Transformanten war.

Bei dem im 2. Beispiel beschriebenen pyrF-Gen handelt es sich  
25 um ein neues Selektionsmarkergen für die Transformation von *Trametes versicolor*. Bei den Stämmen *Trametes versicolor* F2 100C2-1, F2 100C2-8 und F2 100C4-13 handelt es sich um die ersten bisher beschriebenen pyrF-defizienten Stämme von *Trametes versicolor*. Diese pyrF-defizienten Stämme können als Wirtsorganismen dienen für die Transformation von *Trametes versicolor*  
30 und sind somit neue wertvolle Wirtsorganismen für die Proteinexpression und Proteinsekretion in filamentösen Pilzen aus der Klasse der Basidiomyceten. Die Verwendung des Stammes F2 100C2-1 zu diesem Zweck wird in den folgenden Beispielen beschrieben.

## 7. Beispiel

### Transformation von *pyrF*-defizienten *Trametes versicolor* Stämmen mit dem *pyrF*-Gen aus *Trametes versicolor*

#### 5 A: Isolierung von Transformanten

Protoplasten von *T. versicolor* F2 100C2-1 wurden nach dem im 5. Beispiel beschriebenen Verfahren hergestellt. Dabei war das Anzuchtmedium für den auxotrophen Stamm mit 10 mM Uridin supplementiert worden. Es wurde mit dem Vektor *pyrF61* (beschrieben im 10 3. Beispiel), bzw. *pPyrFgap* (beschrieben im 4. Beispiel) transformiert.

Wie im 5. Beispiel beschrieben, wurden Protoplasten von *Trametes versicolor* F2 100C2-1 hergestellt und in einer Endkonzentration von  $10^6$ /ml suspendiert. In Inkubationsgefäßen von 12 ml 15 Volumen wurden 0,1 ml Aliquots der Protoplasten mit je 10 µg DNS des betreffenden Plasmids gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde langsam und unter wiederholtem Mischen 1,25 ml einer PEG4000 Lösung zum Transformationsansatz gegeben. Nach 20 weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße mit dem im 5. Beispiel beschriebenen OMT-Medium aufgefüllt, gemischt und 10 min bei 4°C bei 2000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und auf osmotisch stabilisierten MMS-Platten ohne Uridin (beschrieben im 6. Bei- 25 spiel) ausplattiert. Die Platten wurden bei 28°C für 14 Tage inkubiert und auf Wachstum von Kolonien überprüft. Bei verschiedenen Experimenten wurden Transformationsraten von 0,5 - 3 Transformanten/µg Plasmid DNS erzielt.

#### 30 B: Reinigung der Transformanten

Mycel der erhaltenen Transformanten wurde gepickt und durch Ausplattieren auf frische Platten mit MM-Medium gereinigt. Dabei wurde das Inokulum punktförmig in der Mitte der Platte aufgebracht. Nach Inkubation für ca. 7 Tage bei 28°C konnte radiales Mycelwachstum beobachtet werden. Dieser Reinigungsvorgang 35

wurde wiederholt, wobei das Mycel für das Inokulum vom Rand der ersten Reinigungsplatte entnommen wurde. MM-Platten wurden dann erneut mit Inokulum der zweiten Reinigungsplatte inokuliert und bei 28°C inkubiert, bis die Platten vollständig mit Mycel be-  
5 wachsen waren.

### **C: Analyse der Transformanten**

Transformanten von *Trametes versicolor* wurden mittels Southernblot Analyse auf die Integration des Plasmids PyrF61, untersucht. Dazu wurde von verschiedenen Transformanten und als  
10 Kontrolle dem pyrF-defizienten Stamm F2 100C2-1 Zellmycel in Flüssigkultur hergestellt (siehe 2. Beispiel, Malzextrakt-medium, für F2 100C2-1 mit 10 mM Uridin versetzt). Von dem isolierten Mycel wurde chromosomale DNS isoliert wie im 2. Bei-  
15 spiel beschrieben.

Von den untersuchten Transformanten und dem nicht transformierten, Uridin-auxotrophen Ausgangsstamm F2 100C2-1 wurden je 3 µg der chromosomalen DNS, von pyrF61 100 ng des Plasmids mit  
20 Nco I geschnitten, anschließend durch Agarose Gelelektrophorese getrennt und auf Nylonfilter (Qiagen) geblottet. Als DNS-Sonde wurde Nco I geschnittenes Plasmid pyrF61 verwendet, nicht-radioaktiv markiert wie im 1. Beispiel beschrieben. Mit dieser DNS-Sonde konnten sowohl das pyrF Gen sowie die Vektoranteile  
25 aus dem jeweiligen Plasmid nachgewiesen werden.

Die Hybridisierungstemperatur für die auf Nylonfilter geblottete DNS mit der nicht-radioaktiv markierten DNS-Sonde betrug 60°C. Ansonsten wurden die in der Fachliteratur beschriebenen  
30 Bedingungen für Southernblots eingehalten. Southernblots wurden durch Autoradiographie ausgewertet. Neben anderen Fragmenten konnten zwei, vom pBK CMV-Vektoranteil von pyrF61 stammende Nco I Fragmente mit einer Länge von 0,7 kb, bzw. 1,9 kb detektiert werden. Diese beiden Fragmente konnten nur in den Transforman-  
35 ten, nicht jedoch in dem Uridin-auxotrophen Stamm F2 100C2-1

nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt, daß bei der Transformation des Uridin-auxotrophen Stammes *Trametes versicolor* F2 100C2-1 das Plasmid *pyrF61* in das Genom integriert worden war und zur produktiven Expression des Selektionsmarkergens *pyrF* führte, wodurch die Uridin Auxotrophie dieses Stammes komplementiert wurde.

## 8. Beispiel

### Verwendung des *pyrF*-Gens zur Herstellung Laccase- überproduzierender *Trametes versicolor* Stämme

#### A. Transformation von *T. versicolor*

Protoplasten von *T. versicolor* wurden nach dem im 5. Beispiel beschriebenen Verfahren hergestellt. Zur Transformation verwendet wurde der im 2. Beispiel beschriebene Vektor *pyrF61* sowie der Laccase Expressionsvektor *pLac3gap*. Die beiden Vektoren wurden in Co-Transformationsexperimenten verwendet, wo das Selektionsmarkergen und das zu exprimierende Gen auf getrennten Plasmiden enthalten sind. Die Herstellung von *pLac3gap* ist in in DE-A-19814853, 6. Beispiel, offenbart. In *pLac3gap* ist das Gen für die Laccase III aus *T. versicolor* funktionell mit dem dem GAPDH Promotor aus *T. versicolor* verknüpft.

Wie im 7. Beispiel beschrieben, wurden Protoplasten des *pyrF*-defizienten Stammes *Trametes versicolor* F2 100C2-1 hergestellt und in einer Endkonzentration von  $10^8$ /ml suspendiert. In Inkubationsgefäßen von 12 ml Volumen wurden 0,1 ml Aliquots der Protoplasten mit je 10 µg DNS der Plasmide *pLac3gap* und *pyrF61* gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde langsam und unter wiederholtem mischen 1,25 ml einer PEG4000 Lösung zum Transformationsansatz gegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße mit dem im 5. Beispiel beschriebenen OMT-Medium aufgefüllt, gemischt und 10 min bei 4°C bei 2000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und auf osmotisch stabilisiertem MM-Medium ohne Uridin (beschrieben im 6. Beispiel) ausplattiert. Die Platten



wurden bei 28°C für 14 Tage inkubiert und auf Wachstum von Kolonien überprüft. Bei verschiedenen Experimenten wurden Transformationsraten von 0,5 - 3 Transformanten/ $\mu$ g DNS des Selektionsmarkerplasmids pyrF61 erzielt.

5

Die erhaltenen Transformanten wurden gepickt und wie im 7. Beispiel beschrieben zweimal durch Ausplattieren auf frischen Platten mit MM-Selektionsmedium ohne Uridin gereinigt. Selektivplatten wurden dann erneut mit Inokulum der zweiten Reinigungsplatte inokuliert und nachdem die Platten vollständig mit Mycel bewachsen waren, wurde die Laccaseproduktion in Schüttelkolbenanzuchten überprüft.

#### **B: Anzucht im Schüttelkolben**

15 Für die Anzucht im Schüttelkolben wurden 2 cm<sup>2</sup> Mycel aus einer voll bewachsenen Platte ausgestochen, steril zerkleinert und damit eine Vorkultur von 50 ml (in einem 250 ml Erlenmeyerkolben) Malzextrakt-Medium (siehe 1. Beispiel) beimpft. Die Vorkultur wurde 6 Tage bei 28°C unter Schütteln bei 120 rpm inkubiert. Am sechsten Tag wurde die Vorkultur mit einem Ultra  
20 Turrax für 30 sec bei 9500 rpm homogenisiert und damit 250 ml Hauptkulturmedium (Zusammensetzung siehe MM-Medium im 6. Beispiel) in einem 1 l Erlenmeyerkolben beimpft. Die Hauptkultur wurde dann wieder bei 28°C unter Schütteln bei 120 rpm inkubiert. Die Laccaseproduktion wurde ab dem zweiten Tag der An-  
25 zucht täglich gemessen. Laccaseaktivität wurde photometrisch mit dem Substrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethyl-Benzthiazolin-6-Sulfonsäure) bei 420 nm gemessen. (Extinktionskoeffizient von ABTS bei 420 nm  $\epsilon_{420}$ :  $3,6 \times 10^4$  [l x Mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]). Dabei ent-  
30 sprach 1 U Laccaseaktivität dem Umsatz von 1  $\mu$ mol ABTS/min bei 37°C und einem pH von 4,5. Das Maximum der Laccaseproduktion in Schüttelkolbenanzuchten wurde 10 - 14 Tage nach Beginn der Hauptkultur erreicht. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich verschiedener Transformanten mit dem nicht transformierten Ausgangs-  
35 stamm *Trametes versicolor* F2 100. Für den nicht transformierten

Stamm F2 100 wurde darüberhinaus die Laccaseproduktion nach Induktion mit dem in der Literatur beschriebenen Induktor 2,5-Xylidin (Yaver et al., Applied and Environmental Microbiology (1996) 62, 834 - 841) bestimmt. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen, ist die Laccaseproduktion im Schüttelkolben bei den besten Transformanten des Stammes F2 100 gegenüber dem nichttransformierten Ausgangsstamm um den Faktor 14 (ohne Induktion), bzw. um den Faktor 6 (mit Induktion) erhöht.

10 **Tabelle 2**

Stamm <i>Trametes versicolor</i>	Maximale Laccaseproduktion (U/ml)
F2 100	4,60
F2 100/Xylidin*	11,20
TV L3F-4	15,20
TV L3F-7	42,50
TV L3F-9	17,60
TV L3F-14	51,50
TV L3F-21	33,90
TV L3F-29	64,80
TV L3F-35	35,10
TV L3F-38	13,80
TV L3F-51	56,70

\* Die Induktion mit erfolgte drei Tage nach Beginn der Hauptkultur durch Zugabe von 2,5-Xylidin (1,5 mM Endkonzentration).

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektrochem.  
Industrie GmbH  
Zielstattstr. 20 - 22

81379 München

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
<p>Name: Consortium für elektrochem. Industrie GmbH Anschrift: Zielstattstr. 20 - 22  81379 München</p>	<p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11972  Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung<sup>1</sup>: 1998-01-28</p>
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
<p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1998-01-28<sup>1</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p>(X)<sup>2</sup> lebensfähig ( )<sup>2</sup> nicht mehr lebensfähig</p>	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>3</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weis</i></p> <p>Datum: 1998-02-02</p>

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektrochem.  
Industrie GmbH  
Zielstattstr. 20 - 22  
81379 München

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: F2 100	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11972
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>( ) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-01-28 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weis</i></p> <p>Datum: 1998-02-02</p>


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektro-  
chemische Industrie GmbH  
Zielstattstr. 20

81379 München

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: TV-1	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11523
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde  <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung  eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1997-04-25 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: 1997-04-29


<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

## INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektro-  
chemische Industrie GmbH  
Zielstattstr. 20

81379 München

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Consortium für elektro- chemische Industrie GmbH Anschrift: Zielstattstr. 20  81379 München	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11523  Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> : 1997-04-25
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1997-04-25 <sup>1</sup> geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>2</sup> lebensfähig <input type="checkbox"/> <sup>2</sup> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST <sup>4</sup>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:    Datum: 1997-04-29

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

<sup>4</sup> Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

**Patentansprüche:**

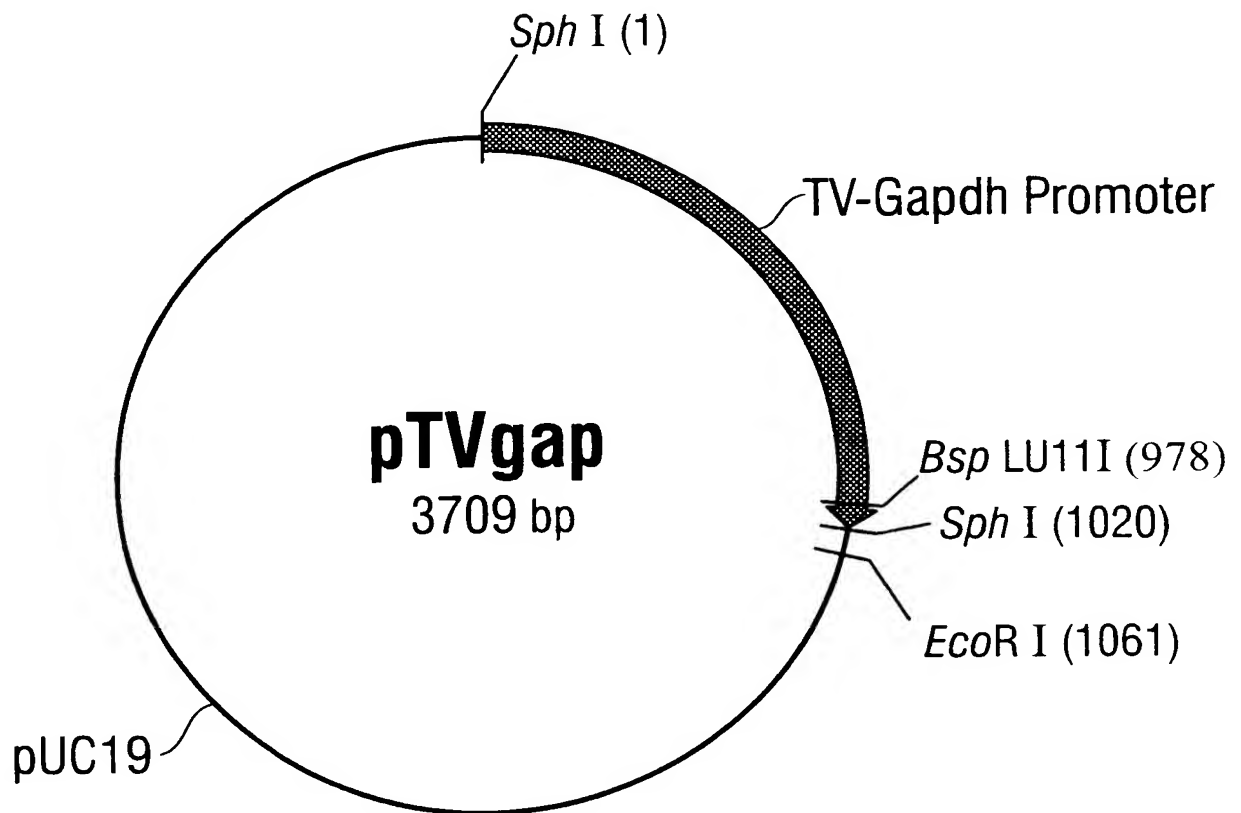
1. DNS-Sequenz, die für ein Protein mit Enzymaktivität der O-  
rotsäure-Phosphoribosyltransferase (pyrF-Aktivität) kodiert,  
5 dadurch gekennzeichnet, daß sie die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1  
ab Position 1133 bis einschließlich Position 1877 umfaßt o-  
der  
die DNS-Sequenz SEQ ID NO:2 ab Position 1 bis einschließlich  
Position 684 umfaßt oder  
10 eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 60 %  
zu den genannten Bereichen der DNS-Sequenz SEQ ID NO:1, oder  
SEQ ID NO:2 umfaßt.
2. Protein mit pyrF-Aktivität dadurch gekennzeichnet, daß es  
15 die Aminosäure-Sequenz SEQ ID NO:3 umfaßt oder eine Amino-  
säure-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 60 % zu  
der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3.
3. Expressionsvektor dadurch gekennzeichnet, daß er eine DNS-  
20 Sequenz gemäß Anspruch 1 umfaßt.
4. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Ex-  
pressionsvektor gemäß Anspruch 3 enthält.
- 25 5. Verfahren zur Herstellung von Pilzstämmen, die zur effizien-  
ten Expression und Sekretion von Proteinen befähigt sind,  
bei dem ein Pilzstamm mit einem auxotrophen Gendefekt als  
Wirtsstamm mittels an sich bekannter Verfahrensschritte mit  
einem Expressionsvektor, der ein Gen zur Komplementation des  
30 auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm besitzt, in einem  
Transformationsansatz transformiert wird und aus dem Trans-  
formationsansatz mit dem Expressionsvektor transformierte  
Klone durch Selektion auf Komplementation des auxotrophen  
Gendefekts ausgewählt werden, wobei die Expression des Gens  
35 zur Komplementation des auxotrophen Gendefekts im Wirtsstamm

durch ein genetisches Regulationselement kontrolliert wird, das im Wirtsstamm aktiv ist, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsstamm ein Uridin-auxotropher Pilz ausgewählt aus den Gattungen Trametes, Coriolus und Polyporus mit einem Gendefekt im pyrF Gen eingesetzt wird.

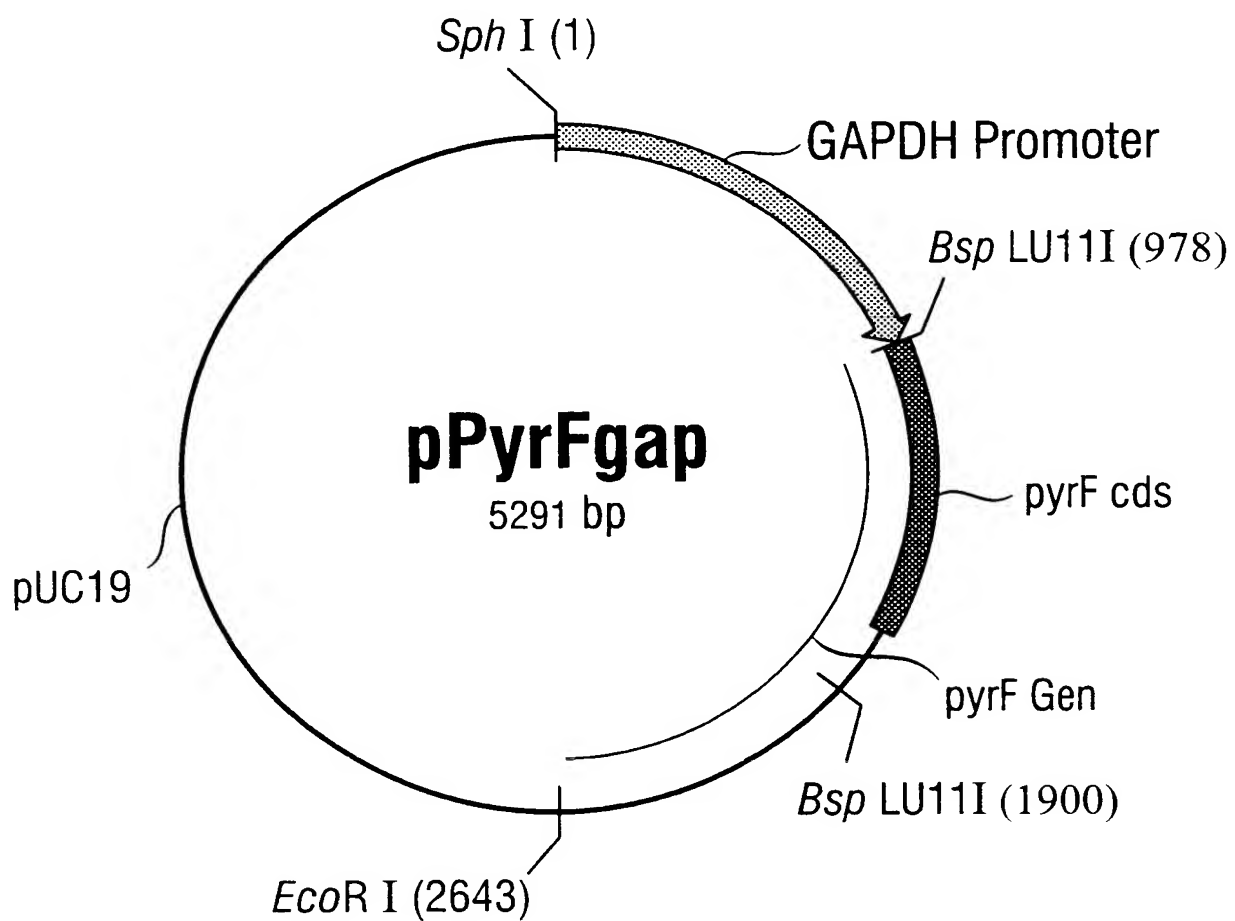
6. Expressionssystem umfassend einen Wirtsstamm ausgewählt aus den Gattungen Trametes, Coriolus und Polyporus mit einem genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus aufgrund dessen der für das Wachstum essentielle Stoffwechselmetabolit Uridin nicht mehr synthetisiert werden kann und der Wirtsstamm auf Minimalmedien ohne Zusatz dieses Stoffwechselmetaboliten nicht mehr zum Wachstum befähigt ist sowie einen Expressionsvektor enthaltend ein Selektionsmarkergen, welches den auxotrophen Gendefekt des Wirtsstammes komplementiert, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsstamm als genetischen Defekt im Stoffwechselmetabolismus einen Defekt im pyrF Gen besitzt, und das Selektionsmarkergen, das pyrF Gen aus einem Pilz der Klasse der Basidiomyceten ist.

7. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionssystem gemäß Anspruch 6 enthaltend ein das Protein kodierendes Gen in an sich bekannter Weise zur Proteinproduktion eingesetzt wird oder daß ein Mikroorganismus gemäß Anspruch 5 enthaltend ein das Protein kodierendes Gen oder ein Pilzstamm hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 4 enthaltend ein das Protein kodierendes Gen in an sich bekannter Art und Weise kultiviert wird und das Protein aus der Kultur gewonnen wird.



***Fig. 1***



***Fig. 2***



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Consortium für elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> pyrF Gen und seine Verwendung

<130> Co9904

<140>

10 <141>

<160> 7

<170> PatentIn Vers. 2.0

15

<210> 1

<211> 3448

<212> Dann

<213> Trametes versicolor

20

<220>

<221> gene

<222> (1133)..(1377)

25

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1132)

30

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1878)..(3448)

<220>

<221> intron

35

<222> (1226)..(1286)

<400> 1

gatctcgagt aggatggaga acggtataac gatgccagag atgataggtg tccagcggta 60

40

gttgggaacg aggcgtgtcta ggtcggcggtt cttgtcgtcg gtcggccaga ggtacgattt 120

gaggcgagag tatagagata tccctaggag tgtgacgtca tccgacgagt taccctccgc 180

45

ggtatgttgt gtactgtcca cttctccgg gtcagacggg tgtgatgtac tgcgtccggg 240

ttggagcgtc aggaaaagcg cagacaggct gaagagtcct attccgccgc agaagggtgtg 300

cgagggggaa agtgccagtg tagcagtgag gcgtgcctac gatatgagac ggacatggtc 360

50

agtatctatg cccgggtcaag gtcgccgcac agacctcact gtaacctcat ggcaatgtcg 420

cggatgcaca aagcaggtag agatgttcaa atggggcacg gagegggtcg tccggagcgc 480

55

tctccctcgg ctctttgcaa ggcagctggc ggatgtttgg tcagttgagg tactgcatcc 540

cttgcaatag cgaaaacagc tcaccagacg tgagtatatg ctgtatacgg gagaaggaag 600

cggaacaccg tgagtggaaag agatgaagtg gttatgaata catcccggtg gaggttgagt 660

60

ctaacagcgt cggatctcgc tgcgttccgg agcagaggcc cggtagcagc gccgggtgtct 720



getcgtgttc cggcacgcgc tatgctcgta aatcaccttt agaaaacttg aataagtgag 780  
 agaagatacg aaacgtcagt ctgcacctat ggagatatgt aaaaatcgca aaaacatagc 840  
 5 gttgacgcta taaaaaagaa aaggacaaaa tgaccacgcg aggggtcgaa cctgcaatct 900  
 cctgatccct aggtttgaag gttcatcacc tcaattcgta gtcagacgcg atgccatttc 960  
 10 gccaggcggc cgttagaaac gaaactacta cgtttaaacg cgggtataac acagccatgt 1020  
 attccgtgcg ggccgcgcgc ccgataagct tgttttcgtg aactgtcttc cccctcctgc 1080  
 atctcgattc tggacctcca tgcgcgcgac gatcccttc ttcacactca ccattgtcgt 1140  
 15 cgaaaaatac cagacagagc tcatcgagca cggcatgacc gccggcggcg tcaagttcgg 1200  
 gaccttcacc ctcaaatcag gccggctcgt cccctcccta ggcgcgcgcg cgtctctccc 1260  
 20 gtgaacgctc cctcaccccg cgcaggacct cgcctactt ctccaaagcc gccctgctcg 1320  
 cgtccggggc cgtgctcgac acgtgtgct ccgcgtacgc cgcgaagatc gccgcgcgcg 1380  
 tcaaggcgct gcccgggctg ccgcgcttcg acgtgtctt cgggcgcgcg tacaagggca 1440  
 25 tcccgctcgc gccgggggac gcgctgctg tgcacgcgca ccaaggcata acgctcgggt 1500  
 tcgcgtacga ccgcaaggag gogaaggatc atggggaggg cgggataact gtgggcgcgc 1560  
 30 cgggtgaggg caagcgcgct ctggtgctgg acgacgtcgc gacggcgggc acggcgatcc 1620  
 gccaggcgat tgagactgtg acgaaggagg ggggcgaggt cgttggcgcg gtgttgatgc 1680  
 tcgatccgca ggaggtgggc aaggagggga agagcacgct tgcggaggtg gaggcgctgt 1740  
 35 tgggcgggaa gggaacgtgt ccgacgatcc tgaggatgaa ggacctcatg aagtggttgc 1800  
 aggagcacgc ccggacggag gagcttgcca agatgcaaga gtactgggag cagtacggcg 1860  
 40 cgaaggaaag cgaatgagaa gacacgaagg cagttgtgta ctaggtgagt aacaccacgc 1920  
 tacatcgatc catccactaa acccatgcag atgaagacc actgtacat tctcgggtac 1980  
 ctgtcacgtt gaacgcaaa agccgaagat gtgagagta acatgcacat catcccgata 2040  
 45 tatagcaca gaacatgtg taatagaacc tgcagaaaca caaagcatga tcagcaagac 2100  
 tccatgggca ctgagttatg atgaactaac cgtatcacc aaaaacacgc ctcttattcg 2160  
 50 cccaacgcac gacccgaacc ccagttatat cctccacac cgtcgcgcgc agcagcagca 2220  
 gcagcctgct cctgacccct ccgtgggggc acaacatgca cgcgccacac gacattcgca 2280  
 acgccccga cccacccgt cgcgccccca ctacgagact cccgaacca ccgcgcgcgc 2340  
 55 cacgcgggcg ccgtacctgc agccctgagc gagccggtgt caaagacagt ccaccaccag 2400  
 aggtggccga cgacagcccc agagatgctg atggcagcgc cgcgggggac gcccatgagg 2460  
 60 aggtccatgc cgacgagcat gtagggaagg tagatgacgc ggaaggtgat gagccgaag 2520





aaggatgtct gggacccagg tggggcgagc cgggaggaga cgtagggtgag cgcgaggagg 2560  
 agcgcccggg tgtgcacaaa ggtgcgcgagg ggaatgttga ggccttggtg tgaggcgggg 2640  
 5 tagcgcaaa gtcagaggcg ggatgatact attggacgta cgaggatagc aagtccctgcg 2700  
 agcgagagct gccatgcgta gtctgaagag cggcggggga agtggtgtctc ttctagctca 2760  
 10 ttggaatttc gactagtctc aagtgtacgg tctcagtat catcatgtat tgcaacagtg 2820  
 tcatacgcac tagagcatcg caaggtcgaa gatgaagttg atccccgagc ctataaagac 2880  
 aaggtcagca ccgacatggc atgtagtcag acaagattga gtacgcactt cccaagaaga 2940  
 15 agctcgtaaa cactctccag atctacatta agacgtgagt atcgcatacc ttctcagtg 3000  
 ctgacttata ttctatccaa ctacagagac agaaaccac ctcaaacttc tgcgtaacga 3060  
 20 actccttcac aaagacgacc ttgtatattg gcaagatttg caggagcact ggcaaggtga 3120  
 cggcgagaga ggaggcgcat agaaaccgag tgactggagg gattttgcga atctcatcca 3180  
 tgaaagacat cttgaggaga ctggaggtga gtagagcgat agaagtacag caggcagagc 3240  
 25 agagacgacg gcagaatgtg gggaagaaca agcaggagga ggagtagagt gattttgaag 3300  
 taatgaaaag tggcgcaacc taatgcaaag tgtatgaggg acatccgtgg acataaagta 3360  
 30 ttccgcacct cgggcaagac attcaatctc agtaatgcac ttcaacttcg gagttcaact 3420  
 tcaaactcga ctttgaaact tgagatcc 3448

35 <210> 2  
 <211> 684  
 <212> Dann  
 <213> *Trametes versicolor*

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(684)

45 <400> 2  
 atg tcg ctc gaa aaa tac cag aca gag ctc atc gag cac ggc atg acc 48  
 Met Ser Leu Glu Lys Tyr Gln Thr Glu Leu Ile Glu His Gly Met Thr  
 1 5 10 15  
 gcc ggt gcg ctc aag ttc ggg acc ttc acc ctc aaa tca ggc cgg acc 96  
 50 Ala Gly Ala Leu Lys Phe Gly Thr Phe Thr Leu Lys Ser Gly Arg Thr  
 20 25 30  
 tcg ccc tac ttc ttc aac gcc ggc ctg ctc gcg tcc ggg ccc gtg ctc 144  
 Ser Pro Tyr Phe Phe Asn Ala Gly Leu Leu Ala Ser Gly Pro Val Leu  
 35 40 45  
 gag acg ctg tgc tcc gcg tac gcc gcg acg atc gcg cgc gcg ctc aag 192  
 Asp Thr Leu Cys Ser Ala Tyr Ala Ala Thr Ile Ala Arg Ala Leu Lys  
 50 55 60

60



gcg tgc ccc ggg ctg ccc ggc ttc gac gtg ctc ttc ggg ccc ggc tac 240  
 Ala Ser Pro Gly Leu Pro Ala Phe Asp Val Leu Phe Gly Pro Ala Tyr  
 65 70 75 80

5 aag ggc atc ccc ttc ggc ggc ggg acc ggc ctg ctg ctg cac cgc gac 288  
 Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu His Arg Asp  
 85 90 95

10 cac ggc atc acc gtc ggg ttc ggc tac gac cgc aag gag ggc aag gat 336  
 His Gly Ile Thr Val Gly Phe Ala Tyr Asp Arg Lys Glu Ala Lys Asp  
 100 105 110

15 cat ggg gag ggc ggc ata ctt gtg ggc ggc ccc gtg agg ggc aag cgc 384  
 His Gly Glu Gly Gly Ile Leu Val Gly Ala Pro Val Arg Gly Lys Arg  
 115 120 125

20 gtg ctg gtg ctg gac gac gtc ggc acg ggc ggc acg ggc atc cgc cag 432  
 Val Leu Val Leu Asp Asp Val Ala Thr Ala Gly Thr Ala Ile Arg Gln  
 130 135 140

ggc att gag act gtg acg aag gag ggc ggc gag gtc gtc ggc ggc gtg 480  
 Ala Ile Glu Thr Val Thr Lys Glu Gly Gly Glu Val Val Gly Ala Val  
 145 150 155 160

25 ttg atg ctc gat cgc cag gag gtg ggc aag gag ggc aag agc acg ctt 528  
 Leu Met Leu Asp Arg Gln Glu Val Gly Lys Glu Gly Lys Ser Thr Leu  
 165 170 175

30 ggc gag gtg gag ggc ctg ttg ggc ggc aag gga cgt gtg cgc acg atc 576  
 Ala Glu Val Glu Ala Leu Leu Gly Gly Lys Gly Arg Val Pro Thr Ile  
 180 185 190

35 ctg agc atg aag gac ctc atg aag tgg ttg cag gag cac ggc cgc acg 624  
 Leu Arg Met Lys Asp Leu Met Lys Trp Leu Gln Glu His Gly Arg Thr  
 195 200 205

gag gag ctt ggc aag atg caa gag tac tgg gag cag tac ggc ggc aag 672  
 Glu Glu Leu Ala Lys Met Gln Glu Tyr Trp Glu Gln Tyr Gly Ala Lys  
 210 215 220

40 gaa agc gaa tga 684  
 Glu Ser Glu  
 225

45 <210> 3  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Trametes versicolor

50 <400> 3  
 Met Ser Leu Glu Lys Tyr Gln Thr Glu Leu Ile Glu His Gly Met Thr  
 1 5 10 15

55 Ala Gly Ala Leu Lys Phe Gly Thr Phe Thr Leu Lys Ser Gly Arg Thr  
 20 25 30

Ser Pro Tyr Phe Phe Asn Ala Gly Leu Leu Ala Ser Gly Pro Val Leu  
 35 40 45

60



Asp Thr Leu Cys Ser Ala Tyr Ala Ala Thr Ile Ala Arg Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 5 Ala Ser Pro Gly Leu Pro Ala Phe Asp Val Leu Phe Gly Pro Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Gly Thr Ala Leu Leu Leu His Arg Asp  
 85 90 95  
 10 His Gly Ile Thr Val Gly Phe Ala Tyr Asp Arg Lys Glu Ala Lys Asp  
 100 105 110  
 His Gly Glu Gly Gly Ile Leu Val Gly Ala Pro Val Arg Gly Lys Arg  
 115 120 125  
 15 Val Leu Val Leu Asp Asp Val Ala Thr Ala Gly Thr Ala Ile Arg Gln  
 130 135 140  
 20 Ala Ile Glu Thr Val Thr Lys Glu Gly Gly Glu Val Val Gly Ala Val  
 145 150 155 160  
 Leu Met Leu Asp Arg Gln Glu Val Gly Lys Glu Gly Lys Ser Thr Leu  
 165 170 175  
 25 Ala Glu Val Glu Ala Leu Leu Gly Gly Lys Gly Arg Val Pro Thr Ile  
 180 185 190  
 Leu Arg Met Lys Asp Leu Met Lys Trp Leu Gln Glu His Gly Arg Thr  
 195 200 205  
 30 Glu Glu Leu Ala Lys Met Gln Glu Tyr Trp Glu Gln Tyr Gly Ala Lys  
 210 215 220  
 Glu Ser Glu  
 35 225  
  
 <210> 4  
 <211> 26  
 40 <212> Dann  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz:PrimerA  
 45 <220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> (1)..(26)  
  
 50 <220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> (1)..(26)  
 <223> n = i  
  
 55 <400> 4  
 ttyggncng cntayaargg nathcc  
  
 <210> 5  
 60 <211> 23



```

    <212> Dann
    <213> Artificial Sequence

    <220>
5    <223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:PrimerB

    <220>
    <221> primer_bind
    <222> Complement((1)..(23))
10
    <220>
    <221> primer_bind
    <222> Complement((1)..(23))
    <223> n = i
15
    <400> 5
    ttncnccyt cncertgrtc ytt
    23

20    <210> 6
    <211> 35
    <212> Dann
    <213> Artificial Sequence

25    <220>
    <223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:PyF-1

    <220>
    <221> misc_feature
30    <222> (1)..(35)

    <400> 6
    ctagacatgt cgctcgaaaa ataccagaca gagct
    35

35    <210> 7
    <211> 35
    <212> Dann
    <213> Artificial Sequence

40
    <220>
    <223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:PyF-2

    <220>
    <221> misc_feature
45    <222> Complement((1)..(35))

    <400> 7
    ctgtctggta tttttcgagc gacatgtcta gagct
    35

50

```





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/06091

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12N9/10 C12N15/80 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RASMUSSEN JACK B ET AL: "The PYR1 gene of the plant pathogenic fungus Colletotrichum graminicola: Selection by intraspecific complementation and sequence analysis." MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 235, no. 1, 1992, pages 74-80, XP002151888 ISSN: 0026-8925 the whole document	1,2,4
A	EP 0 570 096 A (OJI PAPER CO) 18 November 1993 (1993-11-18) the whole document	
A	WO 98 55628 A (PFALLER RUPERT ; WICH GUENTER (DE); CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Form No.

Application No

PCT/EP 00/06091

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0570096	A	18-11-1993	CA 2091236 A	10-09-1993
			JP 6054691 A	01-03-1994
			US 5362640 A	08-11-1994
WO 9855628	A	10-12-1998	DE 19724039 A	10-12-1998
			AU 8624698 A	21-12-1998
			CN 1259166 T	05-07-2000
			EP 0994950 A	26-04-2000
			NO 995948 A	07-02-2000
			PL 337465 A	14-08-2000

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06091

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/31 C12N9/10 C12N15/80 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, PAJ, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RASMUSSEN JACK B ET AL: "The PYR1 gene of the plant pathogenic fungus Colletotrichum graminicola: Selection by intraspecific complementation and sequence analysis." MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 235, Nr. 1, 1992, Seiten 74-80, XP002151888 ISSN: 0026-8925 das ganze Dokument	1,2,4
A	EP 0 570 096 A (OJI PAPER CO) 18. November 1993 (1993-11-18) das ganze Dokument	
A	WO 98 55628 A (PFALLER RUPERT ; WICH GUENTER (DE); CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE)) 10. Dezember 1998 (1998-12-10) das ganze Dokument	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. November 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Holtorf, S

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Automatic a Aktenzeichen

PCT/EP 00/06091

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0570096	A	18-11-1993	CA	2091236 A	10-09-1993
			JP	6054691 A	01-03-1994
			US	5362640 A	08-11-1994
WO 9855628	A	10-12-1998	DE	19724039 A	10-12-1998
			AU	8624698 A	21-12-1998
			CN	1259166 T	05-07-2000
			EP	0994950 A	26-04-2000
			NO	995948 A	07-02-2000
			PL	337465 A	14-08-2000

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 12 OCT 2001

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts CO 9904	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06091	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 29/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/31		
Anmelder CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE...et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  14/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  10.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Grosskopf, R  Tel. Nr. +49 89 2399 8714  



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-38                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

3-7                      ursprüngliche Fassung

1,2                      eingegangen am                      28/06/2001    mit Schreiben vom    26/06/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/2,2/2                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-6, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den





# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06091

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.  
☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.  
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist  
☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06091

☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-7
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-7
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-7
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt



**Zu Punkt V:**

Die vorliegende Anmeldung basiert auf einem Analogverfahren, nämlich der Verwendung eines pyrF Gens aus *Trametes* zur Transformation und Proteinproduktion in Uridin-auxotrophen *Basidiocymeten*stämmen.

Der nächstliegende Stand der Technik, der im Recherchenbericht zitiert ist, wird durch D1 (RASMUSSEN JACK B ET AL: "The PYR1 gene of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*: Selection by intraspecific complementation and sequence analysis." MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 235, Nr. 1, 1992, Seiten 74-80, XP002151888 ISSN: 0026-8925) repräsentiert, wo eben dieses Verfahren in *Colletotrichum graminicola* beschrieben ist und auf die Verwendbarkeit in anderen Fungi hingewiesen wird.

Es ist für den Fachmann weiter selbstverständlich, dass er bei einer analogen Übertragung dieses Systems auf einen anderen Organismus bevorzugt, die diesem Organismus eigenen Gene verwenden würde.

Einem Analogverfahren (und den dafür verwendeten Produkten) muß in der Regel eine erfinderische Tätigkeit abgesprochen werden, es sei denn dieses Verfahren führt zu überraschenden Ergebnissen. Dies scheint in der vorliegenden Anmeldung nicht der Fall zu sein.

Alternativ könnte einem (Analog-) Verfahren eine erfinderische Tätigkeit zuerkannt werden, wenn dessen Verwendung ein Vorurteil entgegensteht. Auch dies scheint im vorliegenden Fall nicht zuzutreffen.

Somit können den Ansprüchen gegenwärtig keine erfinderische Tätigkeit zuerkannt werden.

Das in D1 beschriebene Gen hat sogar eine Homologie, die größer als 60%. Die Anmelderin hat versucht die Produktansprüche formell neu zu machen, indem die Homologie auf 70% erhöht wurde.

Neben der generellen Verneinung der erfinderischen Tätigkeit aus den oben genannten Gründen, besteht aber zudem bei den Produktansprüchen noch ein Überlappungsbereich mit solchen Produkten, die ohne erfinderisches Bemühen



mit dem in D1 beschriebenen Produkten isoliert werden können, d.h. die Produktansprüche sind nicht einmal auf das (angeblich erfinderische) pyrF Gen aus Basidiomyceten beschränkt sondern umfassen Gene die aus völlig anderen Organismen stammen können und somit genauso leicht mit dem in D1 beschriebenen Gen als Sonde isoliert werden können.

**Zu Punkt IV:**

Aus den oben genannten Gründen, sind das Protein gemäß Anspruch 2 und die allgemeine Verwendung des pyrF-Gens gemäß Ansprüchen 5 bis 7 sind nicht durch ein gemeinsames erfinderisches Konzept miteinander verbunden, denn sie haben weder ein gemeinsames Strukturmerkmal, noch lösen sie ein gemeinsames Problem.





**Patentansprüche:**

1. DNS-Sequenz, die für ein Protein mit Enzymaktivität der O-  
rotsäure-Phosphoribosyltransferase (pyrF-Aktivität) kodiert,  
5 dadurch gekennzeichnet, daß sie die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1  
ab Position 1133 bis einschließlich Position 1877 umfaßt o-  
der  
die DNS-Sequenz SEQ ID NO:2 ab Position 1 bis einschließlich  
Position 684 umfaßt oder  
10 eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 70 %  
zu den genannten Bereichen der DNS-Sequenz SEQ ID NO:1, oder  
SEQ ID NO:2 umfaßt.
2. Protein mit pyrF-Aktivität dadurch gekennzeichnet, daß es  
15 die Aminosäure-Sequenz SEQ ID NO:3 umfaßt oder eine Amino-  
säure-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 70 % zu  
der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:3.

